

08/923815 5610

Tammy
PATENT COOPERATION TREATY

PCT/DE96/01016

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

25 February 1998 (25.02.98)

International application No.

PCT/DE96/01016

International filing date (day/month/year)

10 June 1996 (10.06.96)

Applicant

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

RECEIVED

AUG 27 1998

MATRIX CUSTOMER
SERVICE CENTER

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

F. Zotomayor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT TRANSLATION

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

HCC

3.

Applicant's or agent's file reference K 2337 HU/Wd	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE96/01016	International filing date (<i>day/month/year</i>) 10 June 1996 (10.06.1996)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 09 June 1995 (09.06.1995)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/55, 9/22, 15/70, 1/21, C07K 16/40, A61K 38/46, 48/00, 39/395, G01N 33/573, C12Q 1/68		
Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

RECEIVED

AUG 27 1996

MATRIX CUSTOMER
SERVICE CENTER

Date of submission of the demand 09 January 1997 (09.01.1997)	Date of completion of this report 04 August 1997 (04.08.1997)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office, P.B.5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk, Netherlands Facsimile No. (31-70) 340 3016	Authorized officer Telephone No. (31-70) 340 2040

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE96/01016

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 96/01016

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 2, 4, 5, 6, 8-10	YES
	Claims	3, 7	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 2, 4, 5, 6, 8-10	YES
	Claims	3, 7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims	8-9	NO

2. Citations and explanations

- The following documents (D) cited in the search report are indicated in this report;

D1: EMBL Datenbank Eintrag HS068461, UO6846;
1995; XP002015292

D2: Gene, 1996, 168(2), 267-70

D3: WO-A-90/07572

D4: Cell Death and Differentiation, 1996, 3, 199-206

- The present application comprises a human DNase-active protein defined by its amino acid sequence (fig. 1) and the DNA that codes it.

D1 describes a gene located in the human Xq28 region. Up until the time of the present application no function was disclosed for this gene. It was only after the priority date of the present application that it emerged that the sequence of D1 is part of a DNase gene which appears to be identical to fig. 1 of the present application (D2).

D1 does not therefore detract from either the novelty or inventive step of claims 1, 2 and 4-10.

D3 also describes a human DNase but one which has a different amino acid sequence (fig. 1 of D3) from that of fig. 1 of the present application.

The claimed DNase and its gene are therefore not obvious from the relevant prior art documents.

3. Claims 3 and 7 cannot be recognised under PCT Article 33(2) because of the homology that exists between DNase I (DNase I appears to be an enzyme known from the prior art, see citation in D4) and the DNase being claimed here.

Parts of the DNA sequence correspond to the homologous proteins and would also be hybridised with each other (feature a) and b) of claim 3). As in claim 3 no limiting conditions are indicated DNA fragments with a lower homology would also be hybridised.

Furthermore, in claim 3 a) "a part thereof" is not more precisely defined and therefore also comprises very short regions of some nucleotides which are not allowable under PCT Article 33(2).

In addition it is noted that the DNA from D1 hybridises with the DNA of claim 3 b). It is not hereby important whether the function of the DNA of D1 was already disclosed or not. The fact is that a homologous DNA was already isolated which falls under the definition of claim 3b).

The same applies to claim 3a) as the DNA from D1 exists in isolated form and falls per se under the definition of claim 3a).

4. Homologous proteins have the same epitopes and therefore antibodies which are directed against DNase I would bind the proteins being claimed here. The antibodies of claim 7 are only characterised in

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 96/01016

that they bind the protein of claim 1. Cross reactions between antibodies against DNase I and against the protein of the present application do not appear to be excluded because of the homology. Claim 7 therefore also comprises antibodies which are directed against the known DNase.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 February 1997 (04.02.97)	
International application No. PCT/DE96/01016	Applicant's or agent's file reference K 2337 HU/Wd
International filing date (day/month/year) 10 June 1996 (10.06.96)	Priority date (day/month/year) 09 June 1995 (09.06.95)
Applicant ZENTGRAF, Hanswalter et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 January 1997 (09.01.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Ingrid Hours

Telephone No.: (41-22) 730.91.11

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 06 AUG 1997

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2337 HU/Wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 96/01016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/1996	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/06/1995
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und (PK) C12N15/55		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/01/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 04. 08. 97
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  E. Zellner Tel. _____

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☐ der Beschreibung, Seite/n _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☐ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.
Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☐ der Zeichnungen, Blatt/Abb. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____.
☐ Ansprüche: Nr. _____.
☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
-

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1, 2, 4, 5, 6, 8-10_____	JA
	Ansprüche 3, 7 Nein_____	NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche 1, 2, 4, 5, 6, 8-10_____	JA
	Ansprüche 3, 7_____	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1-7_____	JA
	Ansprüche 8-9_____	NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. In diesem Bescheid sind folgende, im Recherchenbericht zitierte Dokumente (D) genannt;

D1: EMBL Datenbank Eintrag HS068461, UO6846;
1995;YP002015292

D2: Gene, 1996, 168(2), 267-70

D3: WO-A-9 07572

D4: Cell Death and Differentiation, 1996, 3, 199-206

2. Die gegenwärtige Anmeldung umfaßt ein menschliches Protein mit DNase Aktivität, definiert durch dessen Aminosäuresequenz (Fig. 1) und die dazu kodierende DNA.

D1 beschreibt ein Gen welches in der menschlichen Xq28 Region sitzt, für dieses Gen war aber zum Zeitpunkt der gegenwärtigen Anmeldung keine Funktion bekannt. Erst nach dem Prioritätstag der gegenwärtigen Anmeldung stellte sich heraus, daß die Sequenz von D1 Teil eines DNase-Gens ist, welches identisch zu Fig. 1 der gegenwärtigen Anmeldung scheint (D2).

D1 greift also weder die Neuheit noch die erfinderische Tätigkeit der Ansprüche 1,2 und 4-10 an.

D3 beschreibt ebenfalls eine menschliche DNase, welche aber eine andere Aminosäuresequenz (Fig. 1 von D3) als die von Fig. 1 der gegenwärtigen Anmeldung aufweist.

Die beanspruchte DNase und deren Gen sind also durch die relevanten Dokumente nicht nahegelegt.

3. Die Ansprüche 3 und 7 können aufgrund der Homologie die zwischen DNase I (DNase I scheint ein aus dem Stand der Technik bekanntes Enzym zu sein, siehe Zitate in D4) und der hier beanspruchten DNase besteht nicht unter Artikel 33 (2) PCT anerkannt werden.

Teile der DNA Sequenz stimmen zwischen homologen Proteinen überein und würden auch miteinander hybridisieren (Merkmal a) und b) des Anspruchs 3). Da in Anspruch 3 keine limitierenden Bedingungen angegeben sind, würden auch DNA Fragmente mit geringerer Homologie hybridisieren.

Außerdem ist in Anspruch 3 a) "ein Teil davon" nicht näher definiert und umfaßt daher auch sehr kurze Bereiche von einigen Nukleotiden, die nicht unter Artikel 33 (2) PCT gewährbar sind.

Zusätzlich ist noch anzumerken, daß die DNA von D1 mit der DNA des Anspruchs 3 (b) hybridisiert. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Funktion der DNA von D1 schon bekannt war, oder nicht. Tatsache ist, daß eine homologe DNA bereits isoliert wurde, die unter die Definition des Anspruchs 3b) fällt.

Das Gleiche gilt auch für den Anspruch 3a), da die DNA von D1 in isolierter Form existiert und per se unter die Definition des Anspruchs 3a) fällt.

4. Homologe Proteine weisen gleiche Epitope auf und daher

würden Antikörper, die gegen DNase I gerichtet sind, auch das hier beanspruchte Protein binden. Die Antikörper des Anspruchs 7 sind nur dadurch gekennzeichnet, daß sie das Protein des Anspruchs 1 binden. Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern gegen DNase I und gegen das Protein der gegenwärtigen Anmeldung erscheinen aufgrund der Homologie nicht ausgeschlossen. Daher umfaßt der Anspruch 7 auch Antikörper die gegen die bekannte DNase gerichtet sind.

Translation of the relevant parts of the PCT Preliminary
International Examination Report, dated Aug. 4, 1997

International File No.: PCT/DE 96/01016

Applicant: Deutsches Krebsforschungszentrum et al.

Attorney's File: K 2337

I. Basis of the Report

1. This report was drafted on the basis of
the international application as filed originally.
-

- V. Substantiated ascertainment pursuant to Art. 35(2) as
regards novelty, inventive step and susceptibility of
industrial application; documents and explanations in
support of this ascertainment
-

1. Ascertainment

novelty	claims 1,2,4,5,6,8-10	yes
	claims 3,7	no
inventive step	claims 1,2,4,5,6,8-10	yes
	claims 3,7	no
susceptibility	claims 1-7	yes
of ind. appln.	claims 8-9	no

2. Documents and explanations

1. The following documents (D) cited in the search report are mentioned in this Official Letter;

D1: EMBL data bank entry HS068461, U06846; 1995;
YP002015292

D2: Gene, 1996, 168(2), 267-70

D3: WO-A-9 07572

D4: Cell Death and Differentiation, 1996, 3,
199-206

2. The present application comprises a human protein having DNase activity, defined by its amino acid sequence (fig. 1) and the DNA coding thereto.

D1 describes a gene which is located in the human Xq28 region. However, no function was known for this gene at the time of the present application. Only after the priority date of the present application turned it out that the sequence of D1 is part of a DNase gene which seems to be identical with fig. 1 of the present application (D2).

Thus, D1 does not attack either novelty or inventive step of claims 1, 2 and 4-10.

D3 also describes a human DNase which has, however, an amino acid sequence (fig. 1 of D3) other than that of fig. 1 of the present application.

Thus, the claimed DNase and its gene are not suggested by the relevant documents.

3. Because of the homology which exists between DNase I (DNase I seems to be an enzyme known from

the prior art, see quotations in D4) and the DNase claimed herein, claim 3 and 7 cannot be recognized under Article 33(2) PCT.

Portions of the DNA sequence correspond between homologous proteins and would also hybridize with one another (features a) and b) of claim 3). Since claim 3 does not give any limiting conditions, DNA fragments having less homology would also hybridize.

In addition, the expression "a portion thereof" in claim 3 a) is not defined in more detail and thus also comprises very short regions of some nucleotides which are not allowable under Article 33 (2) PCT.

Moreover, it has to be remarked that the DNA of D1 hybridizes with the DNA of claim 3 (b). In this connection, it is irrelevant whether the function of the DNA of D1 was previously known or not. It is a fact that a homologous DNA was previously isolated which falls under the definition of claim 3b).

The same also applies to claim 3a), since the DNA of D1 exists in isolated form and falls per se under the definition of claim 3a).

4. Homologous proteins have the same epitopes and thus antibodies which are directed against DNase I would also bind the protein claimed herein. The antibodies of claim 7 are only characterized in that they bind the protein of claim 1. It appears that cross-reactions between antibodies against DNase I and against the protein of the present application are not ruled out because of the homology. Therefore, claim 7 also comprises antibodies which are directed against the known DNase.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

EINGEGANGEN

2 1. OKT. 1996

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2337 HU/Wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE96/ 01016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/96	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/06/95
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,

☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
☒ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,

☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2337 HU/Wd	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 96/ 01016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10/06/1996	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/06/1995
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/55		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

1. Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser **BERICHT** umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☐ Außerdem liegen dem Bericht **ANLAGEN** bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT)
- Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:
- I ☒ Grundlage des Berichts
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/01/1997	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 04. 08. 97
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter  E. Zellner Tel.

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☒ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☐ der Beschreibung, Seite/n _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☐ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.
Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☐ der Zeichnungen, Blatt/Abb. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.
Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____.
☐ Ansprüche: Nr. _____.
☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1, 2, 4, 5, 6, 8-10 _____	JA
	Ansprüche 3, 7 Nein _____	NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche 1, 2, 4, 5, 6, 8-10 _____	JA
	Ansprüche 3, 7 _____	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1-7 _____	JA
	Ansprüche 8-9 _____	NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. In diesem Bescheid sind folgende, im Recherchenbericht zitierte Dokumente (D) genannt;

D1: EMBL Datenbank Eintrag HS068461, UO6846;
1995;YP002015292

D2: Gene, 1996, 168(2), 267-70

D3: WO-A-9 07572

D4: Cell Death and Differentiation, 1996, 3, 199-206

2. Die gegenwärtige Anmeldung umfaßt ein menschliches Protein mit DNase Aktivität, definiert durch dessen Aminosäuresequenz (Fig. 1) und die dazu kodierende DNA.

D1 beschreibt ein Gen welches in der menschlichen Xq28 Region sitzt, für dieses Gen war aber zum Zeitpunkt der gegenwärtigen Anmeldung keine Funktion bekannt. Erst nach dem Prioritätstag der gegenwärtigen Anmeldung stellte sich heraus, daß die Sequenz von D1 Teil eines DNase-Gens ist, welches identisch zu Fig. 1 der gegenwärtigen Anmeldung scheint (D2).

D1 greift also weder die Neuheit noch die erfinderische Tätigkeit der Ansprüche 1,2 und 4-10 an.

D3 beschreibt ebenfalls eine menschliche DNase, welche aber eine andere Aminosäuresequenz (Fig. 1 von D3) als die von Fig. 1 der gegenwärtigen Anmeldung aufweist.

Die beanspruchte DNase und deren Gen sind also durch die relevanten Dokumente nicht nahegelegt.

3. Die Ansprüche 3 und 7 können aufgrund der Homologie die zwischen DNase I (DNase I scheint ein aus dem Stand der Technik bekanntes Enzym zu sein, siehe Zitate in D4) und der hier beanspruchten DNase besteht nicht unter Artikel 33 (2) PCT anerkannt werden.

Teile der DNA Sequenz stimmen zwischen homologen Proteinen überein und würden auch miteinander hybridisieren (Merkmal a) und b) des Anspruchs 3). Da in Anspruch 3 keine limitierenden Bedingungen angegeben sind, würden auch DNA Fragmente mit geringerer Homologie hybridisieren.

Außerdem ist in Anspruch 3 a) "ein Teil davon" nicht näher definiert und umfaßt daher auch sehr kurze Bereiche von einigen Nukleotiden, die nicht unter Artikel 33 (2) PCT gewährbar sind.

Zusätzlich ist noch anzumerken, daß die DNA von D1 mit der DNA des Anspruchs 3 (b) hybridisiert. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Funktion der DNA von D1 schon bekannt war, oder nicht. Tatsache ist, daß eine homologe DNA bereits isoliert wurde, die unter die Definition des Anspruchs 3b) fällt.

Das Gleiche gilt auch für den Anspruch 3a), da die DNA von D1 in isolierter Form existiert und per se unter die Definition des Anspruchs 3a) fällt.

4. Homologe Proteine weisen gleiche Epitope auf und daher

würden Antikörper, die gegen DNase I gerichtet sind, auch das hier beanspruchte Protein binden. Die Antikörper des Anspruchs 7 sind nur dadurch gekennzeichnet, daß sie das Protein des Anspruchs 1 binden. Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern gegen DNase I und gegen das Protein der gegenwärtigen Anmeldung erscheinen aufgrund der Homologie nicht ausgeschlossen. Daher umfaßt der Anspruch 7 auch Antikörper die gegen die bekannte DNase gerichtet sind.

Der Antrag ist bei der zuständigen mit internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS
----------------------	---------------------------

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2337 HU/Wd
Internationales Aktenzeichen PCT/DE96/01016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 10. Juni 1996	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 9. Juni 1995
Bezeichnung der Erfindung Protein mit DNase-Aktivität		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 69120 Heidelberg		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Zentgraf, Hanswalter Bluntschlistr. 6 69115 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Poustka, Annemarie Werderstr. 36 69120 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): AT	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.		

Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER

*Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.*Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*COY, Johannes
In den schwarzen Gärten 1
63762 Grossostheim

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*Velhagen, Iris
Goethestr. 14
68723 Schwetzingen

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

☐

Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

- Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
- und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
- ☐ wird hiermit bestellt; eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
- ☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Patentanwälte
Huber & Schübler
Truderinger Str. 246
81825 München

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

- ☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☐ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
- ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

- ☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten *(das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind)* ausgenommen
-
-
- (Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)*

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|---|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | | |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln aufführen) : | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

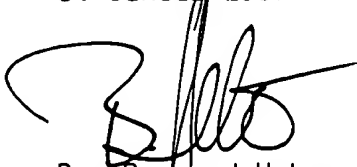
Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | Scheck |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

8. Januar 1997


Dr. Bernard Huber
Patentanwalt

HUBER & SCHÜSSLER

Patentanwälte · Patent Attorneys
Truderinger Straße 246 · 81825 München
Tel. 089/42 72 47 48 · Fax 089/42 72 47 49

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS:
2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b):
3. ☐ Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. ☐ Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet
4. ☐ Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5.
5. ☐ Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT.

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:

PCT

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG

Anlage zum Antrag auf internationale vorläufige Prüfung

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung
beauftragten Behörde auszufüllen

Internationales
Aktenzeichen PCT/DE96/01016

Aktenzeichen des
Anmelders oder Anwalts K 2337 hu/wd

Eingangsstempel der IPEA

Anmelder

Deutsches Krebsforschungszentrum

Berechnung der vorgeschriebenen Gebühren

1. Gebühr für die vorläufige Prüfung 3000, -- P
2. Bearbeitungsgebühr (Anmelder aus einigen Staaten
haben Anspruch auf eine Ermäßigung der
Bearbeitungsgebühr um 75%. Hat der Anmelder (oder
haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so
beträgt der in Feld B einzutragende Betrag 25 % der
Bearbeitungsgebühr.) 292, -- B
3. Gesamtbetrag der vorgeschriebenen Gebühren
Addieren Sie die Beträge in den Feldern
P und B und tragen Sie die Summe in
das nebenstehende Feld ein 3292, --
- INSGESAMT

Zahlungsart

- ☐ Abbuchungsauftrag für das laufende Konto bei der IPEA (siehe unten)
- ☒ Scheck
- ☐ Postanweisung
- ☐ Bankwechsel
- ☐ Barzahlung
- ☐ Gebührenmarken
- ☐ Kupons
- ☐ Sonstige (einzeln angeben):

Abbuchungsauftrag (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Behörden)

- Die IPEA/ _____ ☐ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.
- ☐ (dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Vorschriften der IPEA über laufende Konten dieses Verfahren erlauben) wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 6	C12N15/55 A61K38/46	C12N9/22 A61K48/00
	C12N15/70 A61K39/395	C12N1/21 G01N33/573
	C07K16/40 C12Q1/68	
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 6 C12N C07K A61K G01N C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,90 07572 (GENENTECH INC) 12.Juli 1990 siehe Seite 3, Zeile 19 - Zeile 29 siehe Seite 11, Zeile 26 - Seite 16, Zeile 7 siehe Seite 17, Zeile 7 - Zeile 34; Abbildungen 1,2	1-10
A	EMBL Datenbank Eintrag HS068461 Zugriffsnummer U06846; 4 Juni 1995 BIUNNO I. ET AL.: 'Identification of a novel gene (XIB) in the human Xq28 region' XP002015292	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
7. Oktober 1996		18. 10. 96
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Montero Lopez, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANZUSEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, Bd. 3, Nr. 2, 1.April 1996, Seiten 199-206, XP000603900 JOHANNES F. COY ET AL.: "Isolation, differential splicing and protein expression of a DNase on the human X chromosome" siehe Zusammenfassung siehe Seite 199, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 200, linke Spalte, Absatz 3 siehe Seite 201, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 202, rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 204, rechte Spalte, Absatz 2 ---</p>	1-10
P,X	<p>GENE (1996), 168(2), 267-70 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, 1996, XP002015290 PERGOLIZZI, ROSSANA ET AL: "Cloning of a gene encoding a DNase I-like endonuclease in the human Xq28 region" siehe Zusammenfassung siehe Seite 267, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 269, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1 ---</p>	1-3
P,X	<p>HUMAN MOLECULAR GENETICS, Bd. 4, Nr. 9, September 1995, OXFORD GB, Seiten 1557-1564, XP002015291 JULIA E. PARRISH ET AL.: "A muscle-specific DNase I-like gene in human Xq28" siehe Zusammenfassung siehe Seite 1558, linke Spalte, Absatz 3 - rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 1560, linke Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 1560, rechte Spalte, Absatz 4; Abbildung 3 -----</p>	1-3

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9007572	12-07-90	AU-B- 630658	05-11-92
		AU-A- 4826590	01-08-90
		CA-A- 2006473	23-06-90
		EP-A- 0449968	09-10-91
		JP-T- 4502406	07-05-92

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 8-9
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
"Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 8-9 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizier-Verfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird) beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung."
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen)

K 2337 HU/Wld

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Protein mit DNase-Aktivität

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

ZENTGRAF, Hanswalter
Bluntschlistr. 6
69115 Heidelberg

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Bernard Huber
Grafinger Str. 2
81671 München

Telefonnr.:

089/49057-245

Telefaxnr.:

089/49057288

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

POUSTKA, Annemarie
Werderstr. 36
69120 Heidelberg

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten
- ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika
- ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika
- ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

COY, Johannes
In den schwarzen Gärten 1
63762 Grossostheim

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten
- ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika
- ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika
- ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

VELHAGEN, Iris
Goethestr. 14
68723 Schwetzingen

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☒ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten
- ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika
- ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika
- ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
- ☐ Anmelder und Erfinder
- ☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten
- ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika
- ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika
- ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KZ Kasachstan, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik
Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input type="checkbox"/> LT Litauen | |
| <input type="checkbox"/> LU Luxemburg | |
| <input type="checkbox"/> LV Lettland | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH

Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) Deutschland	9. Juni 1995	195 21 046.8	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☒ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / EPA

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt): _____ Datum (Tag/Monat/Jahr): _____ Aktenzeichen: _____

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 4 Blätter
 2. Beschreibung : 10 Blätter
 3. Ansprüche : 1 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 1 Blätter
 Insgesamt : 17 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Unterzeichnete gesonderte Vollmacht 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 4. ☐ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen): 8. ☒ Sonstige (einzeln auflisten):
 Text f. Priobeleg

Abbildung Nr. _____ der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Dr. Bernard Huber

München, 10.6.1996

Patentanwalt

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: <u>ISA /</u>	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

PCT

Von Anmeldeamt auszufüllen

BLATT FÜR DIE GEBÜHRENBERECHNUNG
Anhang zum Antrag

Internationales Aktenzeichen

Aktenzeichen des Anmelders
oder Anwalts

K 2337 Wd

Eingangsstempel des Anmeldeamts

Anmelder

Deutsches Krebsforschungszentrum et al.

BERECHNUNG DER VORGESCHRIEBENEN GEBÜHREN

1. ÜBERMITTLUNGSGEBÜHR 150 2. RECHERCHEGEBÜHR 2400 Die internationale Recherche ist durchzuführen von EPA
(Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig,
ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll.)

3. INTERNATIONALE GEBÜHR

Grundgebühr

Die internationale Anmeldung enthält 17 Blätter.umfaßt die ersten 30 Blätter 955 x - Anzahl der Blätter Zusatzblattgebühr
über 30Addieren Sie die in Feld g₁ und g₂ eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld G ein

Bestimmungsgebühren

Die internationale Anmeldung enthält 3 Bestimmungen.3 x 232 -

Anzahl der zu zahlenden Bestimmungsgebühr

Bestimmungsgebühren (maximal 11)

Addieren Sie die in Feld G und B eingetragenen
Beträge, und tragen Sie die Summe in Feld I ein (Anmelder aus einigen Staaten haben Anspruch auf eine Ermäßigung der internationalen Gebühr von
75%. Hat der Anmelder (oder haben alle Anmelder) einen solchen Anspruch, so beträgt der in Feld I
einzutragende Gesamtbetrag 25% der Summe der in Feld G und B eingetragenen Beträge.)4. GEBÜHR FÜR PRIORITÄTSBELEG 35

5. GESAMTBETRAG DER ZU ZAHLENDEN GEBÜHREN

Addieren Sie die in Feldern Ü, R, I und P eingetragenen Beträge,
und tragen Sie die Summe in das nebenstehende Feld ein
☐ Die Bestimmungsgebühren werden jetzt noch nicht gezahlt.

ZAHLUNGSWEISE

- | | | |
|--|---|--|
| <input type="checkbox"/> Abbuchungsauftrag (siehe unten) | <input type="checkbox"/> Bankwechsel | <input type="checkbox"/> Kupons |
| <input type="checkbox"/> Scheck folgt | <input type="checkbox"/> Barzahlung | <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln angeben): |
| <input type="checkbox"/> Postanweisung | <input type="checkbox"/> Gebührenmarken | |

ABBUCHUNGSAUFTRAG (diese Zahlungsweise gibt es nicht bei allen Anmeldeämtern)

- Das Anmeldeamt/ ☐ wird beauftragt, den vorstehend angegebenen Gesamtbetrag der Gebühren von meinem laufenden Konto abzubuchen.
- ☐ wird beauftragt, Fehlbeträge oder Überzahlungen des vorstehend angegebenen Gesamtbetrags der Gebühren meinem laufenden Konto zu belasten bzw. gutzuschreiben.
- ☐ wird beauftragt, die Gebühr für die Ausstellung des Prioritätsbelegs und seine Übermittlung an das Internationale Büro der WIPO von meinem laufenden Konto abzubuchen.

Kontonummer

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Unterschrift

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg

Protein mit DNase-Aktivität

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit DNase-Aktivität, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Es ist bekannt, daß viele Zellen einen programmierten Zelltod erleiden. Dieser Zelltod wird mit Apoptose bezeichnet. Er findet sich z.B. bei der Organentwicklung und Metamorphose, der Gewebeatrophie und Tumorregression. Apoptose ist mit einer Kondensation des Cytoplasmas, einem Verlust von Plasmamembranvilli, einer Segmentation des Kerns und insbesondere einem extensiven Abbau chromosomaler DNA verbunden. Letzteres zeigt sich darin, daß in apoptotischen Zellen eine "Leiter" von DNA-Fragmenten, insbesondere der Größe von mehr als 600 kb, 50-300 kb und 50 kb, vorliegt. Bisher ist nicht bekannt, welche Mechanismen für den Abbau der chromosomalen DNA verantwortlich sind. Dies wäre aber notwendig, um Apoptose besser verstehen und gegebenenfalls Maßnahmen für oder gegen sie ergreifen zu können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der Abbau chromosomaler DNA in apoptotischen Zellen untersucht werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Bereitstellung der Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protein mit DNase-Aktivität, das die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder ein funktionelles Derivat oder Fragment davon umfaßt.

5 Der Ausdruck "DNase-Aktivität" weist daraufhin, daß das Protein einzel- und/oder doppelsträngige DNA schneiden kann.

10 Der Ausdruck "funktionelles Derivat oder Fragment" umfaßt jegliches Derivat oder Fragment der Aminosäuresequenz von Fig. 1, das eine DNase-Aktivität aufweist. Auch kann die Aminosäuresequenz von Fig. 1 Additionen, Substitutionen und/oder Deletionen von ein oder mehreren Aminosäuren aufweisen, was auch für die funktionellen Derivate oder Fragmente davon gilt.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Protein kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 20 (a) die DNA von Fig. 1 oder einen Teil davon,
(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
(c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

25 Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

30 Die DNA von Fig. 1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als JFC4 unter DSM 9993 am 23. Mai 1995 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer Cosmid-Bibliothek, z.B. q1Z (vgl. Dietrich, A. et al., Nucleic Acids Res. 19, (1991), 2567-2572) auszugehen, von der Klone die Region Xq27.3-Xqter des menschlichen Genoms umfassen. Solche Klone werden auf einer Filtermembran fixiert und mit markierten, aus mRNA von Schweinegeweben, z.B. Gehirn, Muskel, Leber, durch reverse Transkription erhaltenen cDNA-Pools hybridisiert (vgl. Coy, J.F. et al., Mammalian Genome 5, (1994) 131-137). Diejenigen Klone, die mit den cDNA-Pools ein Hybridisierungssignal aufweisen, werden zum Screening einer menschlichen cDNA-Bibliothek, z.B. von fötalem Gehirngewebe, verwendet. Hierfür eignet sich besonders die cDNA-Bibliothek λ -Zap, Stratagene, Kat.-Nr. 936206. Es wird eine erfindungsgemäße cDNA erhalten.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, wobei letzterer bevorzugt ist, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fu-

sionsproteins exprimiert werden kann.

5 Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-
fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die
erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein
solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls
Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-
des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper
kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw.
monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere
Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklona-
len Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon
15 zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-
sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann
dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklo-
nalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

20 Ein bevorzugter Antikörper der vorliegenden Erfindung, nämlich der monoklonale
Antikörper 11/78/1, wurde bei der DSM unter DSM ACC2211 am 26. April
1995 hinterlegt.

25 Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den Abbau chromosomaler DNA in
apoptotischen Zellen zu untersuchen. Diese Untersuchung kann an isolierten
Körperflüssigkeiten einer Person durchgeführt werden. Mit einem erfindungs-
gemäßen Antikörper kann eine für vorstehenden Abbau verantwortliche DNase
nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen Protein ein
gegen diese DNase gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide
30 Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot,
einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen.
Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere

einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für vorstehende DNase kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

5 Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für oder gegen Apoptose, zu ergreifen. Diese Maßnahmen umfassen die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Gegenstandes an eine Person. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann eine vorstehende DNase inhibiert werden, wodurch der Abbau von chromosomaler DNA verhindert wird. Andererseits kann mit einem
10 erfindungsgemäßen Protein, insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, dieser Abbau gefördert werden, was sich insbesondere zur Behandlung von Tumorzellen eignen würde. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle
15 eines in bestimmten Geweben, z.B. Tumoren, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Proteins in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung einer vorstehenden DNase genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die
20 Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung der für vorstehende DNase kodierenden Gens verwendet.

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zur diagnostischen und therapeutischen Erfassung von Apoptose dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Proteins mit DNase-Aktivität.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Proteins

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins wurde die DNA von Fig. 1 als Template verwendet. Es wurde ein PCR-Verfahren durchgeführt. Als Primer-Paar wurde verwendet: 5'-CAGGGATCCGATGACGATGACAAAATGCACTACCCAAC TGCAC-3' und 5'-GGGGGATCCTCAGGCAGCAGGGGACACAG-3'. Der PCR-Ansatz bzw. die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

PCR-Ansatz

Template DNA (Fig. 1)	: 1 μ l = 1 ng
Pfu-Polymerase 10x-Puffer	: 10 μ l = 1 x
DMSO	: 10 μ l = 10 %
dNTP's	: 1 μ L = je 200 μ M
Oligonukleotide, je 1,5 μ l	: 3 μ l = je 150 ng
H ₂ O-bidest	: ad 99 μ l

PCR-Bedingungen

- 92°C - 5 min
- Zugabe von 1 μ l Pfu-Polymerase (Stratagene) = 2,5 Einheiten
- Zugabe von Paraffin

PCR

92°C 1 min	}	1 Zyklus
58°C 1 min		
72°C 10 min		
92°C 1 min	}	39 Zyklen
58°C 1 min		
72°C 2 min		
72°C 10 min		1 Zyklus

Die amplifizierte DNA wurde mit BamHI gespalten und in die einzige BamHI-

Stelle des Expressionsvektors pQE-8 (Diagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/DNaseX erhalten. Dieses kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/DNaseX wurde zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wurde eine 35 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS

und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
 Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
 Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
 Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
 Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung wurden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
 Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

5 Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

10 Pro Immunisierung wurden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- 15 Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
 Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
 Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
 Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
 Tag 87: Fusion

20 Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen. Einer davon, 11/78/1, wurde bei der DSM unter DSM ACC 2211 am 26. April 1995 hinterlegt.

Beispiel 3: Nachweis der DNase-Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins

25 Es wurde ein DNase-Aktivitätstest entsprechend des Verfahrens von Rosenthal, A.L. & Lacks, S.A., Anal. Biochem. 80, (1977), 76-90 mit Modifikationen durchgeführt. Hierzu wurde ein 18 % SDS-Polyacrylamid-Gel hergestellt, das 2mM EDTA und denaturierte Lachs-Testis DNA oder Hefe RNA bis zu einer
 30 Endkonzentration von 10 µg/ml im Trenn- und Sammelgel enthielt. Proben wurden denaturiert, indem sie 4 min in Laemmli-Probenpuffer, der 5 % 2-Mercaptoethanol enthielt, gekocht wurden. Als Proben wurde ein erfindungsgemä-

5 ßes Protein (von Beispiel 1) und Rinder-DNase 1 (Kontrolle) verwendet. Als Proteinmarker wurde eine 10 kd Leiter (Gibco BRL) verwendet, die in dem gleichen Gel aufgetrennt wurde, nach der Elektrophorese ausgeschnitten und mit Coomassie-Blau angefärbt wurde. Zur Entfernung des SDS nach der Elektrophorese wurde das die Proben enthaltende Gel 4 x 30 min mit 100 ml 40mM Tris-HCl, pH 7,6, gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in 40 mM Tris-HCl, pH 7,6, mit 0,02 % Natriumazid und 2 mM $MgCl_2$, 2mM $CaCl_2$ bzw. mit 2mM $MgCl_2$, 2 mM $ZnCl_2$ inkubiert. Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde der Puffer gewechselt und Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von $2\mu g/ml$ hinzugegeben. Das Gel wurde periodisch auf einem langwelligen UV-Licht untersucht und photographiert.

10 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Protein eine DNase-Aktivität aufweist.

15

Patentansprüche

1. Protein mit DNase-Aktivität, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder ein funktionelles Derivat oder Fragment davon.
2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1.
3. DNA nach Anspruch 2, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA von Fig. 1 oder einen Teil davon,
 - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
4. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2 oder 3.
5. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 4.
6. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 5 unter geeigneten Bedingungen.
7. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
9. Verwendung der DNA nach Anspruch 2 oder 3 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
10. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 7 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

5

Zusammenfassung

Protein mit DNase-Aktivität

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit DNase-Aktivität, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

15

1 CTTGAACGCCTGACCTCGTATCCACCCGCTCAGCCTCCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACCAGCCAGCCCAATAATTATTGATTTTT
99 TAAATTTGTCCAGCCTTCTATTACCAAGTCGAATCCATTAGCTACAGCATCCCATGAGAGCTGAGTGGATTACAGCCCACTCCTGCTCACAGACC
198 CTGTCGAGACACCTATTGTCCCAACAGCATTTACTGACAGACCCCAAGCTGAGTGGTCCCTGCTCCTCTCTGGGGCAGATCCT
297 CAGTCTCCTTGTACTACAGTGTGGCCAGATCATGTGTGACTGTCCCTCTCTTTGGTCTCCAGAGCGTTCATCAACACCCCTAACTCAGAA
396 GTGTCAGCCACACTGGGACTCAGAACCCCAACAGGACAGAGACTCAGCCCTTGGGTGTCGGTTCGTTGGCATCAGGCATGACTTCCAGCTC
495 CTGCGCTTCCCAAGCACTGCTGACTGGGACCCAGACCGGAGTGAAGCAGCGGCTGGCGAGAGCTGGGGTCTCAGTCAGGCACCCAGCCCC
594 TCCTGGTCCAGGCTGAGTGAAGTCAAGCCCTATTACAGGACAGAGCTGCTCTTCTGGGTATCGCGATCCACTTCAAGTACAGGCATGAGGAGCTTGGTGACA
693 AGCTGGTCTGACAGCGCTTCCAGAGCCAGAACTGAGCCAGTGAAGCCACCTGGAGCAGCCTGATTCCTGGGTGTCCCGGAGCCACACACA
792 GCCATGCACTACCCAACTGCACTCCTCTCTCTCATCTGCGCAATGGGCCAGGCTTTCGCACTGCGCCTCAATGCCAGCGGCTGACACTGGCC
891 M H Y P T A L L F L I L A N G A Q A F R I C A F N A Q R L T L A
990 AAGTGGCCAGGAGCAGGTGATGGACACCTTAGTTCGSATACTGGCTGCTGACATCATGTGCTGACGAGGTGGTAGACTCTTCCGGCAGCGCC
K V A R E Q V M D T L V R I L A R C D I M V L Q E V V D S G S A
990 ATCCCCCTCCTGCTTCGAGAACTCAATCGATTGATGGCTGGGCCCTACAGCACCTTGAAGCCCTCAGTGGGCGCAGCACCTACATGGAGACG
1089 I P L L R E L N R F D G S G P Y S T L S S P Q L G R S T Y M E T
TATGTACTTCTATCGGTACACACAAACACAGGTCTGAGTTCCTACGTGTACAACGATGAGGATGACGTCTTTGCCGGGAGCCATTGTGGCCAG
1188 Y V Y F Y R S H K T Q V L S S Y V Y N D E D V F A R E P F V A Q
TTCTTTTGGCCAGCAATGTCTTCCAGCCTGGTGGTCCCGCTGCACACCACTCCTTAAGCCCGTAGAGAGCTGAACGCCCTCTACGATGTG
1287 F S L P S N V L P S L V L V P L H T T P K A V E K E L N A L Y D V
TTCCTGGAGGTCTCCAGCACTGGCAGAGCAGGACGTGATCCTGCTGGGACTTCAATGCTGACTGCGCTTCACTGACCAAAAGCGCTGGACAAG
1386 F L E V S Q H W Q S K D V I L L G D F N A D C A S L T K K R L D K
CTGGAGCTGGGACTGAGCCAGGCTTCCACTGGGTGATTCGGATGGGAGGACACACAGTGGCGCCAGCACCCACTGCACCTATGACCGCGTCTGTG
1485 L E L R T E P G F H W V I A D G E D T T V R A S T H C T Y D R V V
CTGCACGGGAGCGCTGCCGAGTCTGCTGCACACTGGCGTCCCTTTGACTTCCCGCAGAGCTTCCAGCTCACCGAGGAGGCGCTCAACATCAGT
1584 L H G E R C R S L L H T A A F D F P T S F Q L T E E A L N I S
GACCACTACCCCGTGGAGGTGAGCTGAAGCTGAGCCAGGCGCACAGCTCCAGCCTCTCAGCCTCACTGTTCTGTGTGCTATCACTCTCTCCCT
1683 D H Y P V E V E L K L S Q A H S V Q P L S L T V L L L L S L L S P
CAGCTGTGCCCTGCTGCGCTGAGCGTCCCTTACCCCTACCCCGGCTGCTGCGCTTTGGGACTTAAACCCAGCCTCCCGCTCCATCCAGCCCTGGGGC
Q L C P A A *
1782 TGGGGGCTTCAACTATAGTTGCCCTGTGACTGTAGTCCACCCCTGCCCTGCTGTTGATTGGCTCTTGTCTTTGGTTGGCTTGTCCCTAGATTA
1881 GGAGAGGAAGCCAGGGCCCTGCACTCATGCCACCTGCCAGGTAGTGTAGTATCAGGAGTGGAGACAAAGTGGGCTCTGGGTGGGTAGGGGAAGGGA
1980 GGTTCAGAAAGAGGAATGAGATGTTGTATGACAAGAGGAAGTACTGAGAACAAACCCAGATTGTGAGATAGGACACTTGTGCGAGCAGATAT
2079 GCAATGGGCCATGTTTATTGTGGATGGTAAGATCACAGGAACCAATTAAAGCCCAATAGCTACAGGAGGGTGGTTAATCTGCTATATCAAACTC
2178 CTCCCTGAAACAGCAAAACACCGGAAACATTTTGGCTCATTAATAATCCGGTGAACCAATGCAATGCAAGCCTGTATTAACCGCTGAGCAGCCACTC
2277 CACCTCTGGGTGCTGTAGTGTGTGTTGGTACAGGCTTCTGATGCGCTTGTAAAGTCCAGCCAGGCTGGTCAAGGCAACATCTCCACACAGAAAATCT
2376 GCACCAAGTTATGTAAGCTAAAGCTGTGTGAACCCAGGTGTCGCGGAAAGGGCTGCAGGACACAGCAAAATGCCAGCAGCGTCCCGGACCCCTCCCT
2475 TCCATCCTCTCCAAAGAACAGAGGTGAGGAAACACTGCTGGGACGCTAGAAGGGTCTATGTTAACTATTAATCACATTTATGTTTGAACCA
2574 TCACCCCAAGGTAAACCAAAATATAAGGTATGTTTGGCAAAATAAATAAGGTAAATAAAACCTAAAAAATAAAAAA

FIGUR 1

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/55, 9/22, 15/70, 1/21, C07K 16/40, A61K 38/46, 48/00, 39/395, G01N 33/573, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/41887 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. December 1996 (27.12.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01016 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juni 1996 (10.06.96) (30) Prioritätsdaten: 195 21 046.8 9. Juni 1995 (09.06.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZENTGRAF, Hanswalter [DE/DE]; Bluntschlistrasse 6, D-69115 Heidelberg (DE). POUSTKA, Annemarie [AT/DE]; Werderstrasse 36, D- 69120 Heidelberg (DE). COY, Johannes [DE/DE]; In den Schwarzen Gärten 1, D-63762 Grossostheim (DE). VEL- HAGEN, Iris [DE/DE]; Goethestrasse 14, D-68723 Schwet- zingen (DE). (74) Anwälte: HUBER, Bernard usw.; Truderinger Strasse 246, D- 81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: DNASE-ACTIVE PROTEIN (54) Bezeichnung: PROTEIN MIT DNASE-AKTIVITÄT (57) Abstract <p>The present invention relates to a DNase-active protein, a DNA coding it and a process for producing it. The invention also relates to the use of the DNA and the protein and antibodies directed against the protein.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit DNase-Aktivität, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

5

10

Protein mit DNase-Aktivität

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit DNase-Aktivität, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

20

Es ist bekannt, daß viele Zellen einen programmierten Zelltod erleiden. Dieser Zelltod wird mit Apoptose bezeichnet. Er findet sich z.B. bei der Organentwicklung und Metamorphose, der Gewebeatrophie und Tumorregression. Apoptose ist mit einer Kondensation des Cytoplasmas, einem Verlust von Plasmamembranvilli, einer Segmentation des Kerns und insbesondere einem extensiven Abbau chromosomaler DNA verbunden. Letzteres zeigt sich darin, daß in apoptotischen Zellen eine "Leiter" von DNA-Fragmenten, insbesondere der Größe von

25

mehr als 600 kb, 50-300 kb und 50 kb, vorliegt. Bisher ist nicht bekannt, welche Mechanismen für den Abbau der chromosomalen DNA verantwortlich sind. Dies wäre aber notwendig, um Apoptose besser verstehen und gegebenenfalls Maßnahmen für oder gegen sie ergreifen zu können.

30

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der Abbau chromosomaler DNA in apoptotischen Zellen untersucht werden kann.

35

Erfindungsgemäß wird dies durch die Bereitstellung der Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protein mit DNase-Aktivität, das die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder ein funktionelles Derivat oder Fragment davon umfaßt.

5 Der Ausdruck "DNase-Aktivität" weist daraufhin, daß das Protein einzel- und/oder doppelsträngige DNA schneiden kann.

10 Der Ausdruck "funktionelles Derivat oder Fragment" umfaßt jegliches Derivat oder Fragment der Aminosäuresequenz von Fig. 1, das eine DNase-Aktivität aufweist. Auch kann die Aminosäuresequenz von Fig. 1 Additionen, Substitutionen und/oder Deletionen von ein oder mehreren Aminosäuren aufweisen, was auch für die funktionellen Derivate oder Fragmente davon gilt.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Protein kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- 20 (a) die DNA von Fig. 1 oder einen Teil davon,
(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
(c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

25 Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als JFC4 unter DSM 9993 am 23. Mai 1995 hinterlegt.

30 Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer Cosmid-Bibliothek, z.B. q1Z (vgl. Dietrich, A. et al., Nucleic Acids Res. 19, (1991), 2567-2572) auszugehen, von der Klone die Region Xq27.3-Xqter des menschlichen Genoms umfassen. Solche Klone werden auf einer Filtermembran fixiert und mit markierten, aus mRNA von Schweinegeweben, z.B. Gehirn, Muskel, Leber, durch reverse Transkription erhaltenen cDNA-Pools hybridisiert (vgl. Coy, J.F. et al., Mammalian Genome 5, (1994) 131-137). Diejenigen Klone, die mit den cDNA-Pools ein Hybridisierungssignal aufweisen, werden zum Screening einer menschlichen cDNA-Bibliothek, z.B. von fötalem Gehirngewebe, verwendet. Hierfür eignet sich besonders die cDNA-Bibliothek λ -Zap, Stratagene, Kat.-Nr. 936206. Es wird eine erfindungsgemäße cDNA erhalten.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, wobei letzterer bevorzugt ist, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fu-

sionsproteins exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-
fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die
5 erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein
solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls
Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-
des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper
10 kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw.
monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere
Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklona-
len Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon
15 zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-
sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann
dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklo-
nalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein bevorzugter Antikörper der vorliegenden Erfindung, nämlich der monoklonale
Antikörper 11/78/1, wurde bei der DSM unter DSM ACC2211 am 26. April
20 1995 hinterlegt.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den Abbau chromosomaler DNA in
25 apoptotischen Zellen zu untersuchen. Diese Untersuchung kann an isolierten
Körperflüssigkeiten einer Person durchgeführt werden. Mit einem erfindungs-
gemäßen Antikörper kann eine für vorstehenden Abbau verantwortliche DNase
nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen Protein ein
gegen diese DNase gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide
30 Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot,
einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen.
Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere

einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für vorstehende DNase kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

5 Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für oder gegen Apoptose, zu ergreifen. Diese Maßnahmen umfassen die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Gegenstandes an eine Person. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann eine vorstehende DNase inhibiert werden, wodurch der Abbau von chromosomaler DNA verhindert wird. Andererseits kann mit einem
10 erfindungsgemäßen Protein, insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, dieser Abbau gefördert werden, was sich insbesondere zur Behandlung von Tumorzellen eignen würde. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle
15 eines in bestimmten Geweben, z.B. Tumoren, induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Proteins in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung einer vorstehenden DNase genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die
20 Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung der für vorstehende DNase kodierenden Gens verwendet.

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zur diagnostischen und therapeutischen Erfassung von Apoptose dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Proteins mit DNase-Aktivität.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Proteins

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins wurde die DNA von Fig. 1 als Template verwendet. Es wurde ein PCR-Verfahren durchgeführt. Als Primer-Paar wurde verwendet: 5'-CAGGGATCCGATGACGATGACAAAATGCACTACCCAAC TGCAC-3' und 5'-GGGGGATCCTCAGGCAGCAGGGCACAG-3'. Der PCR-Ansatz bzw. die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

PCR-Ansatz

Template DNA (Fig. 1)	: 1 μ l = 1 ng
Pfu-Polymerase 10x-Puffer	: 10 μ l = 1 x
DMSO	: 10 μ l = 10 %
dNTP's	: 1 μ L = je 200 μ M
Oligonukleotide, je 1,5 μ l	: 3 μ l = je 150 ng
H ₂ O-bidest	: ad 99 μ l

PCR-Bedingungen

- 92°C - 5 min
- Zugabe von 1 μ l Pfu-Polymerase (Stratagene) = 2,5 Einheiten
- Zugabe von Paraffin

PCR

92°C 1 min	}	1 Zyklus
58°C 1 min		
72°C 10 min		
92°C 1 min	}	39 Zyklen
58°C 1 min		
72°C 2 min		
72°C 10 min		1 Zyklus

Die amplifizierte DNA wurde mit BamHI gespalten und in die einzige BamHI-

Stelle des Expressionsvektors pQE-8 (Diagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/DNaseX erhalten. Dieses kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/DNaseX wurde zur Transformation von E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wurde eine 35 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS

und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
5 Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein
10 erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-
Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl.
Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die
Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994),
215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine
15 Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war
das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten
mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert.
Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler
Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-
minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrritte mit PBS und
20 anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung
(36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium,
100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis
Banden sichtbar waren.

25 Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden
können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

30 Pro Immunisierung wurden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS
und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

5 Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

10 Pro Immunisierung wurden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- 15 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

20 Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen. Einer davon, 11/78/1, wurde bei der DSM unter DSM ACC 2211 am 26. April 1995 hinterlegt.

Beispiel 3: Nachweis der DNase-Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins

25 Es wurde ein DNase-Aktivitätstest entsprechend des Verfahrens von Rosenthal, A.L. & Lacks, S.A., Anal. Biochem. 80, (1977), 76-90 mit Modifikationen durchgeführt. Hierzu wurde ein 18 % SDS-Polyacrylamid-Gel hergestellt, das 2mM EDTA und denaturierte Lachs-Testis DNA oder Hefe RNA bis zu einer
30 Endkonzentration von 10 µg/ml im Trenn- und Sammelgel enthielt. Proben wurden denaturiert, indem sie 4 min in Laemmli-Probenpuffer, der 5 % 2-Mercaptoethanol enthielt, gekocht wurden. Als Proben wurde ein erfindungsgemä-

5 Das Protein (von Beispiel 1) und Rinder-DNase 1 (Kontrolle) verwendet. Als Proteinmarker wurde eine 10 kd Leiter (Gibco BRL) verwendet, die in dem gleichen Gel aufgetrennt wurde, nach der Elektrophorese ausgeschnitten und mit Coomassie-Blau angefärbt wurde. Zur Entfernung des SDS nach der Elektrophorese wurde das die Proben enthaltende Gel 4 x 30 min mit 100 ml 40mM Tris-HCl, pH 7,6, gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in 40 mM Tris-HCl, pH 7,6, mit 0,02 % Natriumazid und 2 mM $MgCl_2$, 2mM $CaCl_2$ bzw. mit 2mM $MgCl_2$, 2 mM $ZnCl_2$ inkubiert. Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde der Puffer gewechselt und Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 2 μ g/ml hinzugegeben. Das Gel wurde periodisch auf einem langwelligen UV-Licht untersucht und photographiert.

10 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Protein eine DNase-Aktivität aufweist.

Patentansprüche

1. Protein mit DNase-Aktivität, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder ein funktionelles Derivat oder Fragment davon.
2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1.
3. DNA nach Anspruch 2, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA von Fig. 1 oder einen Teil davon,
 - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
4. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2 oder 3.
5. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 4.
6. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 5 unter geeigneten Bedingungen.
7. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
9. Verwendung der DNA nach Anspruch 2 oder 3 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.
10. Verwendung des Antikörpers nach Anspruch 9 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/01016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/55 C12N9/22 C12N15/70 C12N1/21 C07K16/40 A61K38/46 A61K48/00 A61K39/395 G01N33/573 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,90 07572 (GENENTECH INC) 12 July 1990 see page 3, line 19 - line 29 see page 11, line 26 - page 16, line 7 see page 17, line 7 - line 34; figures 1,2 ---	1-10
A	EMBL Datenbank Eintrag HS068461 Zugriffsnummer U06846; 4 Juni 1995 BIUNNO I. ET AL.: 'Identification of a novel gene (XIB) in the human Xq28 region' XP002015292 --- -/--	1-3
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>* & * document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">7 October 1996</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">18. 10. 96</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Montero Lopez, B</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01016

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, vol. 3, no. 2, 1 April 1996, pages 199-206, XP000603900 JOHANNES F. COY ET AL.: "Isolation, differential splicing and protein expression of a DNase on the human X chromosome" see abstract see page 199, right-hand column, paragraph 3 - page 200, left-hand column, paragraph 3 see page 201, right-hand column, paragraph 3 - page 202, right-hand column, paragraph 1 see page 204, right-hand column, paragraph 2</p>	1-10
P,X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>GENE (1996), 168(2), 267-70 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, 1996, XP002015290 PERGOLIZZI, ROSSANA ET AL: "Cloning of a gene encoding a DNase I-like endonuclease in the human Xq28 region" see abstract see page 267, right-hand column, paragraph 2 - page 269, left-hand column, paragraph 2; figure 1</p>	1-3
P,X	<p style="text-align: center;">---</p> <p>HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 4, no. 9, September 1995, OXFORD GB, pages 1557-1564, XP002015291 JULIA E. PARRISH ET AL.: "A muscle-specific DNase I-like gene in human Xq28" see abstract see page 1558, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 see page 1560, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 see page 1560, right-hand column, paragraph 4; figure 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE96/01016

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claims 8-9 relate to a method for treatment of the human or animal body (diagnostic procedure on the human or animal body), the search was carried out, based on the alleged effects of the compound.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0-A-9007572	12-07-90	AU-B- 630658	05-11-92
		AU-A- 4826590	01-08-90
		CA-A- 2006473	23-06-90
		EP-A- 0449968	09-10-91
		JP-T- 4502406	07-05-92

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12N9/22 C12N15/70 C12N1/21 C07K16/40
A61K38/46 A61K48/00 A61K39/395 G01N33/573 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,90 07572 (GENENTECH INC) 12.Juli 1990 siehe Seite 3, Zeile 19 - Zeile 29 siehe Seite 11, Zeile 26 - Seite 16, Zeile 7 siehe Seite 17, Zeile 7 - Zeile 34; Abbildungen 1,2	1-10
A	EMBL Datenbank Eintrag HS068461 Zugriffsnummer U06846; 4 Juni 1995 BIUNNO I. ET AL.: 'Identification of a novel gene (XIB) in the human Xq28 region' XP002015292	1-3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Oktober 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18. 10. 96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Montero Lopez, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, Bd. 3, Nr. 2, 1.April 1996, Seiten 199-206, XP000603900 JOHANNES F. COY ET AL.: "Isolation, differential splicing and protein expression of a DNase on the human X chromosome" siehe Zusammenfassung siehe Seite 199, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 200, linke Spalte, Absatz 3 siehe Seite 201, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 202, rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 204, rechte Spalte, Absatz 2</p>	1-10
P,X	<p>--- GENE (1996), 168(2), 267-70 CODEN: GENED6;ISSN: 0378-1119, 1996, XP002015290 PERGOLIZZI, ROSSANA ET AL: "Cloning of a gene encoding a DNase I-like endonuclease in the human Xq28 region" siehe Zusammenfassung siehe Seite 267, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 269, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1</p>	1-3
P,X	<p>--- HUMAN MOLECULAR GENETICS, Bd. 4, Nr. 9, September 1995, OXFORD GB, Seiten 1557-1564, XP002015291 JULIA E. PARRISH ET AL.: "A muscle-specific DNase I-like gene in human Xq28" siehe Zusammenfassung siehe Seite 1558, linke Spalte, Absatz 3 - rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 1560, linke Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 1 siehe Seite 1560, rechte Spalte, Absatz 4; Abbildung 3</p> <p>-----</p>	1-3

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 8-9
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
"Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 8-9 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers (Diagnostizier-Verfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird) beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung."
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/01016

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9007572	12-07-90	AU-B- 630658	05-11-92
		AU-A- 4826590	01-08-90
		CA-A- 2006473	23-06-90
		EP-A- 0449968	09-10-91
		JP-T- 4502406	07-05-92
